

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A *Thermobifida fusca* TM51-ből származó xilán 1,4- β -D-xilozidáz enzim működési mechanizmusának vizsgálata

Fekete Csaba Attila

Témavezető: Dr. Kiss László

Investigation the mechanism of action of the xylan 1,4- β -xylosidase enzyme from *Thermobifida fusca* TM51

Csaba Attila Fekete

Supervisor: Dr. László Kiss



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2013

1. Bevezetés

A glikozid hidrolázok (glikozidázok) az enzimeknek egy jelentős és nagy változatosságot mutató csoportját képviselik. Ennek a legfőbb oka elsősorban az, hogy a természetben található oligo- és poliszacharidok maguk is rendkívül változatos összetételben fordulnak elő. Ebből következően az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb tudományos érdeklődés mutatkozott ezen enzimek részletesebb tanulmányozása iránt. Jelentőségük nemcsak a biomassa újrahasznosításában érhető tetten, de számos biokémiai folyamatban is kulcsfontossággal bírnak, úgy is mint az élő szervezetben található tartalék tápanyagként szolgáló poliszacharidok mozgósításában, vagy a glikoproteinek, glikolipidek metabolizmusában.

A természetben a teljes biomassa szárazanyag tömegének több mint 90 %-át a különböző növényi eredetű, vázalkotó poliszacharidok teszi ki. Ezek közül is az egyik legfontosabbak a növényi sejtfal jelentős részét képező és a hemicellulóznak a legtekintélyesebb részét kitevő xilánok csoportja. A különböző forrásból származó poliszacharidoknak közös ismérve, hogy szerkezetileg igen nagy változatosságot mutatnak. Ennek köszönhetően a teljes biológiai lebontásukhoz egy komplett mikrobiális enzimrendszere van szükség.

A xilanolitikus enzimrendszer legfontosabb tagjai az *endo-1,4- β -xilanázok* (EC 3.2.1.8), amelyek a xilán főláncát hidrolizálják rövidebb oligoszacharidokra, ezáltal vízdoldhatóvá téve az egyébként vízben oldhatatlan poliszacharidot, valamint a *xilán 1,4- β -xilozidázok* (EC 3.2.1.37), amelyek a xilo-oligoszacharidokról D-xilóz egységeket hasítanak le a nem-redukáló vég felől.

Az utóbbi évtizedekben fény derült arra is, hogy a xilánok nemcsak a természetben, de az iparban is igen nagy jelentőséggel bírnak, mivel az évenként keletkező mezőgazdasági és erdészeti hulladéknak egy jelentős részét alkotják. Az utóbbi időben az ipar számára a xilánok újrahasznosítása egyre nagyobb kihívásnak bizonyult úgy is, mint különböző megújuló energiaforrások (bioetanol), illetve mint kémiai és élelmiszeripari alapanyagok (furfuralok, xilitolok). Ezeken kívül számos más ipari területen is elkezdték alkalmazni ezeket az enzimeket, mint pl.: állat takarmányozásban, élelmiszeriparban, gyógyszeriparban, vegyiparban, textiliparban és papíriparban. A legújabb kutatások pedig arra irányítják a figyelmünket, hogy a

különböző xilooligoszacharidok jelentős humánbiológiai hatással rendelkezhetnek úgy is, mint az immunrendszert erősítő, illetve mint a bélflóra megfelelő egyensúlyára pozitív hatást gyakorló prebiotikus készítmények.

A Debreceni Egyetem TEK TTK Biokémiai valamint Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológia Tanszékén folyó enzimológiai kutatások egyik legjelentősebb iránya a különböző mikrobiális eredetű glikozi-hidroláz enzimek működési mechanizmusának vizsgálata. Ezen kutatási témákba bekapcsolódva egy termofil komposztlakó baktérium által termelt β -D-xilozidáz enzim tanulmányozását végeztem.

2. Célkitűzések

- Célul tűztük ki a *Thermobifida fusca* TM-51-es törzséből származó β -D-xilozidáz enzim előállítását, izolálását illetve tisztítását, transzformált *E. coli* BL21(DE3) expressziós törzsből.
- Célunk volt továbbá az enzim biokémiai jellemzése úgy, mint az optimális működési paraméterek meghatározása, stabilitás vizsgálatok, molekulatömeg meghatározás.
- Ezen kívül terveztük az enzim szubsztrátspecifitásának meghatározását természetes és mesterséges szubsztrátok alkalmazásával.
- Célunk volt még az enzim katalitikus mechanizmusának meghatározása, az aktív centrum feltérképezése szubsztrát analóg inhibitorok alkalmazásával.
- Terveink között szerepelt az enzim aktív centrumának topológiai vizsgálata, oldallánc specifikus reagensek, valamint szubsztrátanalóg affinitásjelölő alkalmazásával.

3. Alkalmazott vizsgálati módszerek

Az általunk vizsgált β -D-xilozidáz enzim egy rekombináns fehérje, amely a *Thermobifida fusca* nevű komposztlakó termofil aktinomicéta TM51-es törzséből származik. Az enzimet kódoló gént, egy pET28a típusú plazmid konstrukció tartalmazta, amely egy *E. coli* BL21(DE3) expressziós törzsbe került transzformálásra,

majd pedig expresszáásra. Ezt követően a fehérjét két lépésben tisztítottuk, elsődlegesen affinitás kromatográfiával, majd anioncserés kromatográfiával. Az enzim tisztulását gélelektroforézissel (SDS-PAGE) ellenőriztük. Az expresszió és a tisztítás eredményeképpen kapott enzimet használtuk a további vizsgálatainkhoz.

Az enzim aktivitását mind természetes, mind pedig mesterséges kromogén szubsztrátok felhasználásával spektrofotometriásan vizsgáltuk. Az enzim szubsztrátspecifitását, illetve kinetikai paramétereit (k_{cat} , K_M , k_{cat}/K_M) a klasszikus Michaelis-Menten egyenlet alkalmazásával, nemlineáris illesztéssel határoztuk meg. Meghatároztuk az enzim aktivitásának optimális paramétereit, illetve végeztünk stabilitási vizsgálatokat is. Vizsgáltuk az enzim szubsztrátspecifitását xilooligomerek felhasználásával is, amelyeket szintén mi állítottunk elő a bükk xilán parciális enzimatis hidrolízisével. A transferáz aktivitás vizsgálatokat egy speciális kromofór csoportot tartalmazó kompetitív inhibitor, mint akceptor jelenlétében végeztük. Natív gélelektroforézis (natív-PAGE) segítségével meghatároztuk az enzim natív molekulatömegét, $^1\text{H-NMR}$ módszert alkalmazva pedig meghatároztuk az enzim által katalizált hidrolitikus reakció sztereokémiáját. A kinetikai paraméterek pH-függése során a disszociábilis, katalitikus aminosav oldalláncok savi disszociációs állandóit a szabad enzimmolekulában (pK_{E1} , pK_{E2}) ill. az enzim-szubsztrát komplexben (pK_{ES1} , pK_{ES2}) ugyancsak nemlineáris illesztéssel határoztuk meg. Az inhibíciós vizsgálatok révén a K_i értékeket a klasszikus Dixon-féle lineáris illesztés segítségével állapítottuk meg.

Az enzim aktív centrumában elvégeztük a katalitikus aminosav oldalláncok kémiai módosítását, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimiddel (EDAC), glicin-metil-észter jelenlétében, illetve egy szubsztrátanalóg affinitásjelölővel az N-brómacetil- β -D-xilopiranozil-aminnal (NBAXA). Ezen kívül meghatároztuk az oldalláncok kémiai módosulásának kinetikai paramétereit (k_i , K_i és k_i/K_i) és az inaktíválódás pH-függését is az egyes inaktívátorokra. Az enzim inaktíválását β -D-xilopiranozil-azid (XylN_3) mint kompetitív inhibitor jelenlétében is elvégeztük. CD spektroszkópia segítségével meghatároztuk, hogy az enzim milyen konformációs változásokon esik át miközben NBAXA-val teljes mértékben inaktíváltuk.

4. Az értekezés új tudományos eredményei

Értekezésemben egy termofil komposztlakó aktinomicéta, a *Thermobifida fusca* TM51-ből származó rekombináns β -D-xilozidáz enzim vizsgálatának eredményeit foglalom össze. Kutatómunkám során elvégeztem az enzim izolálását, tisztítását, biokémiai jellemzését, kinetikai analízisét, illetve működési mechanizmusának meghatározását, valamint aktív centrumának topológiai vizsgálatát különböző reverzibilisen és irreverzibilisen kötődő inhibitorokkal, inaktivátorokkal.

4.1. A β -D-xilozidáz enzim heterológ expressziója és tisztítása

Tekintve, hogy az enzimet nem az eredeti szervezetből izoláltuk, így a fehérjét kódoló gént egy pET28a típusú plazmid konstrukció tartalmazta, amely egy *E. coli* BL21(DE3) expressziós törzsbe került transzformálásra Kukolya József és munkatársai által a Gödöllői Egyetemen. A tenyésztés során az enzim fokozottabb termelését izopropil-1-tio- β -D-galaktopiranozid (IPTG) segítségével indukáltuk, amely általános indukáló ágense a T7/lac hibrid promóternek.

A sejtek feltárása után a kapott felülúszót először affinitás kromatográfiával tisztítottuk egy Amersham Hi TrapTM Chelating HP oszlop segítségével. A következő lépésben a fehérjét Pharmacia DEAE Sepharose anioncserélő töltet alkalmazásával tisztítottuk, közben a tisztulási folyamatot SDS-PAGE módszerrel követtük nyomon. Ennek eredményeképpen az enzimet több mint 95%-os tisztasággal és 91.2%-os kitermeléssel izoláltuk.

4.2. A β -D-xilozidáz enzim biokémiai jellemzése

4.2.1. Az enzim aktivitásának és stabilitásának pH- és hőmérséklet-függése

Az itt végzett vizsgálatok alapján az enzim hőmérséklet és pH optimuma 50 °C-nak és pH 6.0-nak adódott. A stabilitási vizsgálatok bebizonyították, hogy az enzim pH 4.5 és 5.5 között részlegesen, míg 6.0-os és 7.0-es pH-n teljesen megőrzi stabilitását, pH 4.5 alatt viszont az enzim nagyon instabillnak mutatkozott. A hőstabilitás vizsgálatok egyértelműen bizonyították, hogy az enzim 50 °C-on és pH 6.0-on különösen nagy stabilitást mutat hosszabb távon is. Ezzel szemben 60 °C-on részleges, 70 °C-on pedig az enzim teljes mértékben elvesztette az aktivitását.

4.2.2. Az enzim vizsgálata elektroforetikus módszerekkel

Az elektroforetikus módszerekkel elvégzett vizsgálatok eredményei azt igazolták, hogy az enzim molekulatömege denaturáló körülmények között 61 kDa, míg natív-PAGE körülmények között 240 kDa adódott. Ezzel egyértelműen bizonyítottuk, hogy az enzim rendelkezik negyedleges szerkezettel, ami homotetramer formájában jelenik meg. A vizsgálatok azt is egyértelműen bizonyították, hogy az enzim negyedleges szerkezetének fenntartásában sem fém ionok, sem pedig diszulfid-hidak nem játszanak szerepet, hanem hidrogénhid illetve elektrosztatikus valamint hidrofób kölcsönhatások hálózata játszik meghatározó szerepet az enzim negyedleges szerkezetének kialakításában, illetve fenntartásában.

4.3. A β -D-xilozidáz enzim kinetikai paramétereinek meghatározása, illetve azok pH-függése

A kinetikai vizsgálatok eredményei alapján az állapítható meg, hogy az enzim csak és kizárólag a β -D-xilózt tartalmazó szubsztrátokat volt képes hidrolizálni, az α -L-arabinóz, illetve β -D-glükóz tartalmú szubsztrátokat nem. Ez összességében igen nagyfokú specifitást mutat a szubsztrát glikon részét illetően (1. táblázat).

1. táblázat. A TfBXyl43 enzim kinetikai paramétereinek összefoglaló táblázata.

Szubsztrát	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ ×mM ⁻¹]
pNP- β -D-xilopiranozid	0.71±0.05	117.5±2.2	165.5±4.1
Xilobióz	1.55±0.15	63.5±3.2	41±2.3
pNP- α -L-arabinopiranozid	—	—	—
pNP- β -D-glükopiranozid	—	—	—

A kapott eredmények azt bizonyítják, hogy a C-4 helyzetben lévő hidroxilcsoport ekvatoriális térállása alapvetően fontos a megfelelő enzim-szubsztrát komplex kialakításához, ezért a pNP- α -L-arabinopiranozid nem szubsztrátja az enzimnek a hidroxilcsoport axiális térállása miatt. A pNP- β -D-glükopiranozid esetén a C-5 helyzetben lévő hidroximetil-csoport pedig sztérikus gátja ugyanezen komplex sikeres létrejöttének. Az aglikon viszonylatában már sokkal mérsékeltbb specifitás

figyelhető meg tekintettel arra, hogy mind a pNP- β -D-xilopiranozid, mind pedig a xilobióz szubsztrátja az enzimnek.

A kinetikai paraméterek (k_{cat} , k_{cat}/K_M) pH-függése alapján egyértelműen igazolható az, hogy az aktív centrumban, a katalitikus helyen egy deprotonált katalitikus nukleofil, valamint egy protonált katalitikus sav/bázis van jelen, amelyek részt vesznek a katalitikus folyamatban.

4.4. Az enzim szubsztrátspecifitásának vizsgálata xilooligomerekre

A különböző xilooligomerekben végzett vizsgálatok egyértelműen bizonyították, hogy az enzim a xilotrióznál nagyobb polimerizációfokú oligomereket nem fogad el szubsztrátként. A xilobiózt és a xilotriózt teljesen xilózig bontja, ami igazolja, hogy az enzim valóban egy exo-típusú glikozid-hidroláz, amely D-xilóz egységeket hasít le az oligomer láncról.

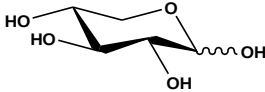
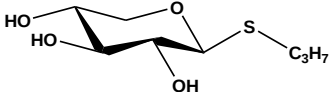
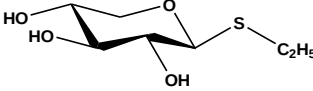
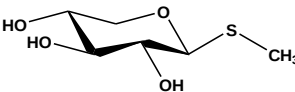
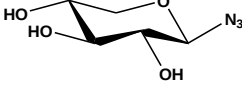
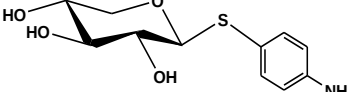
4.5. A hidrolitikus folyamat vizsgálata $^1\text{H-NMR}$ segítségével

A pNP- β -D-xilopiranozid hidrolízisének időbeli követése során, 5.17 ppm-es kémiai eltolódással és 3.57 Hz-es csatolási állandóval egy új dublett megjelenését tapasztaltuk, amely egyértelműen a α -D-xilóz keletkezését mutatja a reakció kezdeti periódusában. A reakció későbbi szakaszában viszont 4.52 ppm-es kémiai eltolódással és 7.27 Hz-es csatolási állandóval egy újabb dublett jelent meg, ami a mutarotáció következtében keletkező β -anomer megjelenésére utal. A kapott eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy az enzim a szubsztrátját inverziós mechanizmus szerint hasítja.

4.6. Inhibíciós vizsgálatok

A korábbi vizsgálatok azt igazolták, hogy az enzim igen nagy specifitást mutat a szubsztrát glikon részének szerkezetére, így az aglikon-kötőhely vizsgálatát különböző β -D-xilopiranozid tartalmú származékok felhasználásával végeztük (2. táblázat).

2. táblázat. Az enzim kompetitív gátló szereinek inhibíciós állandó (K_i) értékeinek összefoglaló táblázata.

Kompetitív inhibitorok	Szerkezet	K_i [mM]
D-xilóz		67
Propil-1-tio- β -D-xilopiranozid		14.4
Etil-1-tio- β -D-xilopiranozid		12.8
Metil-1-tio- β -D-xilopiranozid		10.7
β -D-xilopiranozil-azid		5.1
<i>para</i> -aminotiofenil-1-tio- β -D-xilopiranozid		4.5

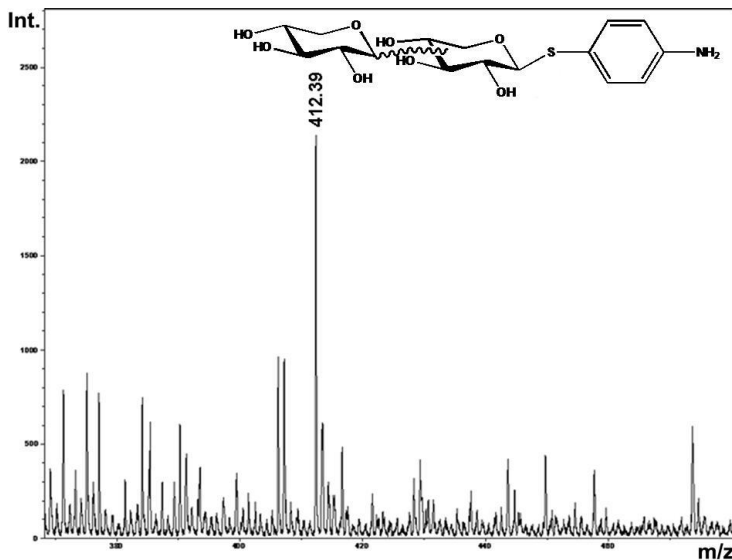
A K_i értékek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az enzim aglikon-kötőhelye alapvetően hidrofób karakterű, ahol döntően aromás aminosav oldalláncok vannak jelen, amelyek igen jelentős π - π kölcsönhatásokat képesek kialakítani az olyan szubsztrátokkal valamint inhibitorokkal, amelyek π elektronokkal rendelkeznek.

4.7. Az β -D-xilozidáz enzim transzferáz aktivitásának vizsgálata

A transzferáz aktivitás vizsgálatok eredményei bebizonyították, hogy az enzim képes xilopiranoz egységet átvinni mind a pNP- β -D-xilopiranozid, mind pedig a

xilobióz donorokról, az akzeptorként alkalmazott para-aminofenil-1-tio- β -D-xilopiranozidra.

Így az enzim által katalizált reakció eredményeképpen para-aminofenil-tio- β -D-xilobióz keletkezik amit MALDI-TOF MS módszerrel igazoltunk (1. ábra).



1. ábra. A transzxilozilezési reakció elegyének MALDI-TOF MS spektruma.

A vizsgálatok igen meglepő eredményt mutattak különösen annak tükrében, hogy a korábbi vizsgálataink során igazoltuk azt, hogy az enzim inverziós mechanizmus szerint hidrolizálja szubsztrátját. Éppen ezért az itt kimutatott transzferáz aktivitás léte egyedülállónak tekinthető az inverziós β -D-xilozidázok körében.

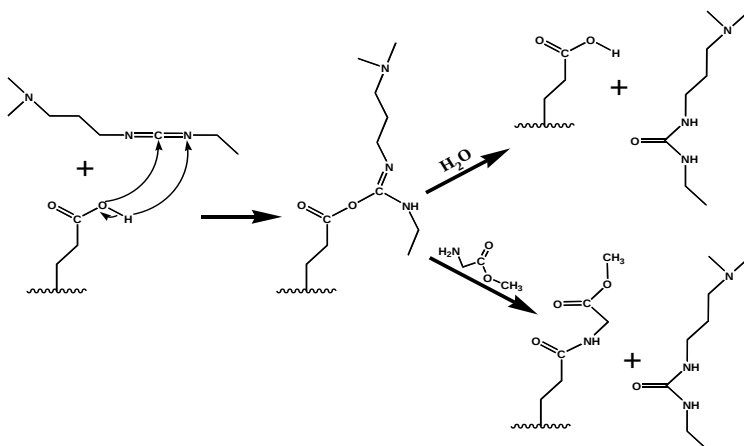
4.8. A katalitikus oldalláncok kémiai módosításának kinetikai vizsgálata

4.8.1. A karboxil oldalláncok specifikus kémiai módosítása

A karboxil aminosav oldalláncok kémiai módosítása során vízben oldódó 1-etil-3-(3-diethylaminopropil)-karbodiimidet (EDAC) használtunk, nukleofilként pedig glicin-metil-észtert. Ennek során a karboxilcsoportokat aktiváljuk az EDAC

segítségével, a glicin-metil-észter pedig az aktivált karboxilcsoportot karbonsav-amiddá alakítja (2. ábra).

A vizsgálatok során kapott eredményeket összegezve az állapítható meg, hogy az enzimet ezek a reagensek teljes mértékben inaktívtá tették. Mivel azonban az EDAC nem aktív centrum specifikus, és az enzimből található más karboxilcsoportokkal is reakcióba léphet, így mi β -D-xilopiranozil-azid, mint kompetitív inhibitor jelenlétében elvégzett vizsgálatok révén igazoltuk, hogy a katalízisben résztvevő karboxilcsoport is módosult az inaktíválódás során.

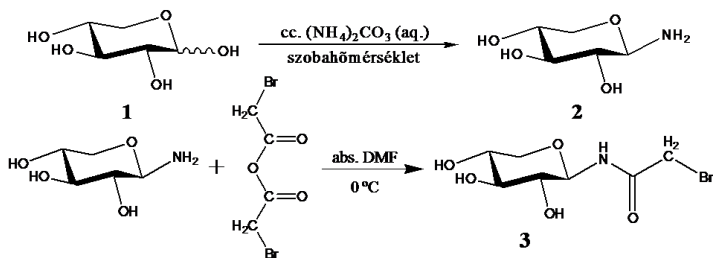


2. ábra. Az EDAC reakciója az enzimből található karboxilcsoporttal, glicin-metil észter jelenlétében, illetve hiányában.

Az inaktíválás pH-függése pedig azt bizonyította, hogy a reakció során a két katalitikus aminosav oldallánc közül katalitikus sav/bázis módosult.

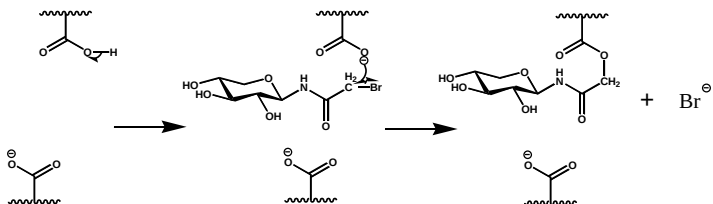
4.8.2. Az enzim kémiai módosítása affinitásjelölővel

Az enzim aktív centrumának további vizsgálatához egy speciális szubsztrátanalóg, úgynevezett affinitásjelölőt az N-bromacetyl- β -D-xilopiranozil-amint (NBAXA) használtuk, amit egy a korábbiaknál egyszerűsített módszerrel szintetizáltunk (3. ábra).



3. ábra. Az NBAXA szintézisének lépései.

Az NBAXA egy olyan szubsztrátanalóg vegyület, amely a brómacetamid csoportja révén képes alkilezni az aktív centrumban található karboxilát csoportot, így észterestítve azt (4. ábra). Ennek köszönhetően, mivel kovalensen kötődik az aktív centrumba, így irreverzibilisen blokkolja a szubsztrát hozzáférést az aktív centrumhoz. A kompetitív inhibitor ebben az esetben is megvédi az aktív centrumban található karboxilát oldalláncot a kémiai módosítástól. Az inaktiválás pH-függése a korábbiakban már leírtakhoz hasonló eredményt mutatott, vagyis ebben az esetben is a katalitikus sav/bázis oldallánc módosult (4. ábra).



4. ábra. Az NBAXA reakciója a katalitikus sav/bázis csoporttal.

Az NBAXA-val valamint az EDAC, glicin-metil-észterrel végzett vizsgálatok eredményei egyértelműen igazolják, hogy a katalitikus sav/bázis mennyire kitüntetett szerepet játszik az inverziós glikozidázok működési mechanizmusában.

4.9. Az NBAXA-val módosított enzim CD spektroszkópai vizsgálata

Az NBAXA-val inaktivált és nem inaktivált enzimek CD spektroszkópai elemzései során kapott eredmények azt bizonyították, hogy amikor egy

szubsztrátanalóg molekula a szubsztrát-kötőhelyre irreverzibilisen kötődik, akkor az enzim egésze átmeneti állapotra jellemző másodlagos szerkezeti változást szenved. Az enzim másodlagos szerkezeti elemeinek rendezett β -redős és β -hurkos szakaszai rendezetlenné váltak az inaktívátor kötődése következtében (3. táblázat).

3. táblázat. Az aktív, valamint az inaktív β -D-xilozidáz enzimek spektrumainak dekonvolúciós kiértékelése.

Enzim	α -hélix	β -redő	β -hurok	Rendezetlen
Aktív	2.6-4.8 %	38.3-43.3 %	19.6-22.4 %	32.2-34.7 %
Inaktív	2.5-3.5 %	29.6-32.9 %	14.7-17.3 %	47.5-52.1 %

5. Az eredmények hasznosításának lehetőségei

A *Thermobifida fusca* TM51-ből származó rekombináns β -D-xilozidáz enzim, a rövid xilooligoszacharidok lebontásában mutatott igen jelentős katalitikus hatékonyságának valamint a működési optimumának körülményei között tapasztalt stabilitásának köszönhetően, egy kiváló jelölt lehet a biomassa újrahasznosításában folytatott és egyre nagyobb jelentőségű eljárások alkalmazásában.

Kihasználva az enzim egészen nagyfokú szubsztrátspecifitását, potenciálisan felhasználható lehet egy xilózra specifikus bioszenzor igen fontos és meghatározó részeként is.

Eredményeink újabb információkkal járultak hozzá a bakteriális eredetű termofil β -D-xilozidáz enzimek működési mechanizmusáról, és aktív centrum topológiájáról eddig megszerzett ismeretek további bővítéséhez. Figyelembe véve az utóbbi időszakban a különböző iparágakban bővülő felhasználásuk iránt mutatott igényt, ezen eredmények is elősegíthetik a β -D-xilozidázok egyre szélesebb körű biotechnológiai, valamint ipari alkalmazását.

6. Publikációs jegyzék

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

1. **Csaba Attila Fekete** and László Kiss
Purification and Characterization of a Recombinant β -D-xylosidase from *Thermobifida fusca* TM51
The Protein Journal (2012) 31(8), 641-650, DOI 10.1007/s10930-012-9440-7
IF: 1,038
2. **Csaba Attila Fekete** and László Kiss
A New Approach in the Active Site Investigation of an Inverting β -D-xylosidase from *Thermobifida fusca* TM51
The Protein Journal (2013) DOI 10.1007/s10930-013-9463-8
IF: 1,038
3. Kukolya József, **Fekete Csaba Attila**, Dóri-Tóth Zoltán, Vanderleyden Jos, Spaepen Stijn, Wilson David B., Kiss László
Cloning and biochemical characterization of a B-xylosidase (XynA). A new member of the hemicellulase enzyme system of *Thermobifida fusca*.
Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (2005) 52 (Suppl.): 87.
IF: 0,787

Egyéb közlemények:

4. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Hemicelluláz enzimek stabilizálása nano-réteggel
Műszaki Szemle (2010) 52, 15-20. ISSN 1454-0746
5. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Stabilization of hemicellulase enzymes with nano-layer
Studia Universitatis Babes-Bolyai Seria Chemia (2010) LIV, 53-62. ISSN 1224-7154 (printed edition) ISSN 2065-9520 (online edition)
IF: 0.231
6. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Cellulase and hemicellulase enzymes as single molecular nanobiocomposites

Hungarian Journal of Industrial Chemistry (2011) 39 (3) 341-348. ISSN: 0133-0276

IF: 0.120

7. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Thermostable enzymes as single molecular nanobiocomposites
Internet Journal of Engineering and Technology for Young Scientists (2011) in press

Előadások és Poszterek:

8. **Fekete Csaba Attila**, Kiss László
A Thermobifida fusca-ból származó intracelluláris β -D-xilozidáz enzim működési mechanizmusának vizsgálata
MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottság Ülése, Mátrafüred, 2007. május 23-25.
9. **Fekete Csaba Attila**, Kiss László
A Thermobifida fusca-ból származó intracelluláris β -D-xilozidáz enzim működési mechanizmusának vizsgálata
A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi Vándorgyűlése, Debrecen, 2007. augusztus 26 – 29.
10. **Csaba Attila Fekete**, Teréz Barna, Rita Elek, Gyula Batta, József Kukolya and László Kiss
Investigation of the Active Site of the intracellular β -D-xylosidase from *Thermobifida fusca*
11th Bratislava Symposium on Saccharides, Smolenice, Slovak Republic, 21-26 September 2008
11. **Fekete Csaba Attila**, Elek Rita, Batta Gyula, Kukolya József, Kiss László és Barna Teréz
A Thermobifida fusca-ból származó intracelluláris β -D-xilozidáz enzim aktív centrumának topológiai vizsgálata
Biokémia, A Magyar Biokémiai Egyesület folyóirata, (2010) XXXIV. ÉVFOLYAM 3. SZÁM, P2-05
12. Rita Elek, Teréz Barna, Ágnes Hubert, **Csaba Attila Fekete**, Gyula Batta, László Kiss and József Kukolya

Transformation of *Thermobifida fusca* β -D-mannosidase to mannosynthase by site-directed mutagenesis

11th Bratislava Symposium on Saccharides, Smolenice, Slovak Republic, 21-26 September 2008

13. Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**, Elek Rita, Batta Gyula, Csendes Gergely, Tóth Ákos Kukolya József
Characterization of the hemicellulolytic system of the plant wall degrader model organism *Thermobifida fusca*
Annual Meeting of the Hungarian Society of Microbiology (2010) Book of abstracts, p.8.
14. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Hemicellulóz bontó egyedi enzim nanorészecskék előállítása (*Single enzyme nanoparticles with hemicellulolytic activity*)
Műszaki Kémiai Napok '10 kiadványa (2010) Veszprém, pp. 208-215
15. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Akrilamid réteggel stabilizált egyedi enzim nanorészecskék aktivitásának vizsgálata
(*Activity measurement of single enzyme nanoparticles using acrylamide layer*)
Műszaki Kémiai Napok '11 kiadványa (2011) Veszprém, pp. 149-156.
16. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Single enzyme nanoparticles using thermostable hemicellulase enzymes, „Challenges in
Physical Chemistry and Nanoscience” (ISACS2), Budapest, Hungary, 13-16 July 2010
17. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Stabilization of cellulase and hemicellulase enzymes as enzyme nanoparticles,
EuroNanoForum 2011, Budapest, Hungary (*electronic version*)

1. Introduction

The glycoside hydrolases (glycosidases) represent an important group within the enzymes and show a great diversity. The main reason is primarily that the oligo- and polysaccharides can be found in high diversity in the nature. Therefore it was an ever growing interest in the investigation of these types of enzymes. Their significance is important not only in the case of the recycling of the biomass but also in other biochemical reactions. Their presence is quite essential in the degradation of the polysaccharides found in the living organisms and in the metabolism of the glycoproteins and glylipides as well.

The xylan is the second most common polysaccharide in the nature after the cellulose, consisting a main chain of β -(1,4)-linked xylose units. This polymer is the major hemicellulosic polysaccharide and it can be found in the plant cell walls both of the hardwoods and cereals. For the complete degradation of xylans synergistic action of several microbial hydrolytic enzymes is required, which is the so-called xylan-degrading system.

The most important xylanolytic enzymes are the endo- β -1,4-xylanases (EC 3.2.1.8), which hydrolyze the insoluble main chain of the xylan into shorter, soluble xylooligosaccharides, and the xylan 1,4- β -xylosidases (EC 3.2.1.37), which hydrolyze the oligosaccharides into single xylose units from nonreducing end.

Recently the interest of the enzymatic degradation of xylan has attracted a lot of interest in many industries. The main reason of using these enzymes is the fact that they considerably decrease both the cost and environmental pollution. In the past decades interest has significantly increased in the case of xylan-degrading enzymes, which can be explained by the ever-growing necessity of the application of environmentally friendly technologies in many different fields and industries such as paper and pulp industry, in animal feed, in manufacture of bread, food and drinks, in pharmaceutical (e.g. xylitol) or chemical and textile industry. The latest investigations show that xylooligosaccharides have good influence in strengthen of the human

immune system, and have also good positive impact regarding the balance of the interstinal flora as prebiotic preparations.

In the Department of Biochemistry and Department of Genetics and Applied Microbiology of the University of Debrecen one of the most important directions of research in enzymology analysis are the examinations of the mechanism of action of different microbial glycoside hydrolase enzymes. In this work we describe a detailed characerization of this bacterial xylan 1,4- β -xylosidase.

2. Aims of the Studies

- Our first objective was the production and purification of the recombinant xylan 1,4- β -xylosidase enzyme from *Thermobifida fusca* TM51 in *E. coli* BL21(DE3) expression strain.
- The other goal of our work was the definition of the biochemical properties of the enzyme like determination of the optimal working parameters, stability and molecular mass investigations.
- Furthermore we planed to investigate the substrate specificity of the enzyme by using natural and artificial substrates.
- In addition we wanted to determine the stereochemistry of the catalysis, mapping of the chemical nature of the active site applying substrate analogue competitive inhibitors.
- We also planed to investigate the topology of the active site of the enzyme by using functional group specific reagents as well as affinity label.

3. Experimental Methods

The xylan 1,4- β -xylosidase enzyme is a recombinant protein which is originated from thermophilic actinomycetes named *Thermobifida fusca* TM51. The gene of the enzyme was cloned in pET28a vector construction as a His-tag fusion protein, which was transformed in a special *E. coli* BL21(DE3) expression strain and was expressed with high effectiveness. After production of the recombinant enzyme, purification was

carried out by immobilized-metal affinity chromatography (IMAC) and anion exchange chromatography. The protein content was determined by either Lowry or Bradford method using BSA as protein standard. The purification of the enzyme was monitored by SDS-PAGE. The purified and homogeneous enzyme was used for further investigations.

The enzyme activity was measured spectrophotometrically by using both natural and artificial chromogenic substrates. Substrate specificity and kinetic parameters (k_{cat} , K_M , k_{cat}/K_M) of the enzyme were determined based on Michaelis-Menten equation applying non-linear regression. Determinations of the optimal working parameters (pH, T) of the xylan 1,4- β -xylosidase and stability investigations were also carried out. The substrate specificity of the enzyme was tested with xylooligomers which were produced by partial enzymatic digestion of the beechwood xylan. The transferase activities were investigated in the presence of a natural and artificial substrate as donors and a chromogen competitive inhibitor as acceptor. The oligomerization degree of the recombinant xylan 1,4- β -xylosidase was determined by native gel electrophoresis (native-PAGE). To investigate whether the enzyme hydrolyzes the substrate by inverting or retaining mechanism we followed the product formation in time by $^1\text{H-NMR}$. The pH dependence of both the turnover number (k_{cat}) and catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) give essential informations about the actual protonation state of the catalytic groups both in the enzyme-substrate complex (pK_{ES1} , pK_{ES2}) and in the free enzyme (pK_{ES1} , pK_{ES2}). The K_i values were determined by Dixon method.

Chemical modification of the catalytic amino acid side chains were performed by using carboxylate specific reagents such as 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDAC) and glycine methyl ester and substrate analogue affinity label, N-bromoacetyl- β -D-xylopyranosylamide (NBAXA). The kinetic parameters (k_i , K_i and k_i/K_i) and pH dependence of the inactivation were also defined for each type of inactivator. Additionally the inactivation of the enzyme was performed in the presence and absence of competitive inhibitor β -D-xylopyranosylazide (XyN_3) to prove that the modification takes place in the active site. CD spectroscopy was used to follow the changes in the secondary structural elements due to the NBAXA inactivation in the case of the inactivated and not inactivated enzymes.

4. New Results of the Dissertation

The present work is a summarization of the results about the investigations of a recombinant xylan 1,4- β -xylosidase originated from *Thermobifida fusca* TM51. During the research work isolation, purification, biochemical characterization and kinetic investigation of the enzyme were performed. Besides it was also a task to develop the stereochemistry of the hydrolysis and to examine the active site topology of the enzyme, by using reversible inhibitors or irreversible inactivators.

4.1. Heterologous Expression and Purification of the xylan 1,4- β -xylosidase

Considering that the enzyme was not isolated from its original organism the enzyme was cloned in a pET28a vector construction and was transformed in *E. coli* BL21(DE3) host by József Kukolya et al in the University of Gödöllő. The increased production of the enzyme was induced by isopropyl-1-thio- β -D-galactoside (IPTG) which is common agent for the T7/lac hybrid promoter.

The recombinant enzyme was a His-fusion protein and its purification was carried out by affinity IMAC chromatography using Hi TrapTM Chelating HP affinity column provided by Amersham, and anion exchange chromatography using Pharmacia DEAE Sepharose resin. Protein samples from each purification steps including the crude cell homogenate along with pre-stained protein standard were analyzed by SDS-PAGE. As a result of the purification the isolated xylan 1,4- β -xylosidase was obtained with purity more than 95% and with yield 91.2%.

4.2. Biochemical Characterization of the xylan 1,4- β -xylosidase Enzyme

4.2.1. Temperature and pH Effect on the Enzyme Activity and Enzyme Stability

Concluding the data from the pH/temperature dependence and stability studies, the optimal parameters for the enzyme were at pH 6.0 and 50 °C. The stability studies proved that the enzyme lost partially its activity between pH 4.5 and 5.5, while it was preserved completely at pH 6.0 and 7.0. However the enzyme lost completely its activity under pH 4.5.

Thermal inactivation studies revealed that the xylan 1,4- β -xylosidase was fully stable with the highest activity at 50 °C and at pH 6.0 not only for shorter but for

longer time period as well. In contrast at incubation at 60 °C partial, at 70 °C complete inactivation was detected.

4.2.2. Analyses of the enzyme with electrophoretic methods

SDS-PAGE investigations showed that the molecular weight of the monomer unit is 62.5 kDa which correlates well with the calculated value, while in native condition xylan 1,4- β -xylosidase is present in a tetramer oligomeric state with a molecular weight of 240 kDa, as was indicated in the native-PAGE experiment (Bollag et al. 1996). Molecular weight and oligomerization studies proved clearly that the enzyme has homo oligomeric quaternary structure. Our results show that metal ions and disulfide-bridges are not involved in maintaining the native structure of the enzyme. More likely in the maintenance of the quaternary structure, hydrogen-bond network coupled with electrostatic and hydrophobic interactions have a significant role in forming the boundary between the polypeptide chains.

4.3. Determination and pH Dependence of the Kinetic Parameters

Results of the kinetic investigations proved clearly that the xylan 1,4- β -xylosidase does not hydrolyze the substrate containing α -L-arabinose and β -D-glucose moieties showing that the enzyme is strictly specific to D-xylose as glycon (Table 1.).

Table 1. Kinetic parameters of the xylan 1,4- β -xylosidase enzyme.

Substrate	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ ×mM ⁻¹]
pNP- β -D-xylopyranoside	0.71±0.05	117.5±2.2	165.5±4.1
Xylobiose	1.55±0.15	63.5±3.2	41±2.3
pNP- β -L-arabinopyranoside	—	—	—
pNP- β -D-glucopyranoside	—	—	—

The results indicate that the equatorial C-4 hydroxyl group plays an essential role in the formation of the enzyme-substrate complex therefore pNP- β -L-arabinopyranoside is not substrate because of the axial orientation of this group. In the case of pNP- β -D-glucopyranoside substrate hydroxymethyl group at the C-5 position

is a steric barrier to the formation of the enzyme-substrate complex. Regarding the aglycon part the enzyme shows much less specificity because both the pNP- β -D-xylopyranoside and the xylobiose were also good substrates for the enzyme.

pH dependence of kinetic parameters (k_{cat} and k_{cat}/K_M) showed the presence of two ionizable amino acid side chains in the catalysis. These results suggest that the presence of a deprotonated (catalytic nucleophile) and a protonated (catalytic acid–base) amino acid group is essential in the hydrolysis.

4.4. Substrate Specificity of the xylan 1,4- β -xylosidase on Xylooligomers

Catalytic activity of the enzyme was tested on xylooligosaccharides with different oligomerisation degree. Substrate specificity investigations on the xylooligomers showed clearly that the substrate acceptance capacity of the enzyme is only limited to xylobiose and xylotriose among the xylooligomers. From these results it follows that the enzyme is an exo-glycosidase which cleaves single D-xylose units from the nonreducing end.

4.5. Determination of the Stereochemistry of the Enzyme Reaction by $^1\text{H-NMR}$

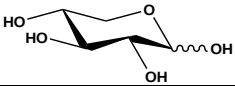
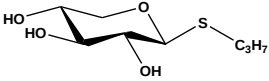
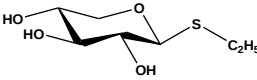
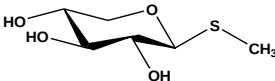
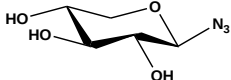
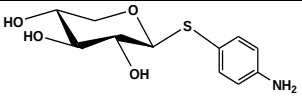
On-line monitoring of the hydrolysis of the pNP- β -D-xylopyranoside showed the appearance of a new doublet with a chemical shift of 5.17 ppm and with a coupling constant of 3.57 Hz in the $^1\text{H-NMR}$ spectra which prove the presence of α -D-xylopyranose in the initial period of the reaction.

However at the later stage of the reaction, formation of β -D-xylopyranose (7.27 Hz and 4.52 ppm) was observed due to the mutarotation. The obtained results prove clearly that the xylan 1,4- β -xylosidase enzyme works with inverting mechanism.

4.6. Inhibition Investigations

The result of the inhibition studies are summarized in the Table 2.

Table 2. Inhibition constants of the competitive inhibitors for the xylan 1,4- β -xylosidase.

Competitive inhibitors	Structure	K_i [mM]
D-xylose		67
1-thiopropyl- β -D-xylopyranoside		14.4
1-thioethyl- β -D-xylopyranoside		12.8
1-thiomethyl- β -D-xylopyranoside		10.7
β -D-xylopyranosylazide		5.1
p-aminophenyl-1-thio- β -D-xylopyranoside		4.5

Based on the obtained K_i results it can be concluded, that the aglycon binding part of the active site is basically hydrophobic. The received values demonstrate also a presence of a relatively strong π - π interaction between the amino acid side chains of aglycon binding site and aryl or azide group in the aglycon of the inhibitor.

4.7. Transferase Activity Studies

Transferase investigations demonstrated undoubtedly that the xylan 1,4- β -xylosidase enzyme is able to transfer xylopyranose unit from both pNP- β -D-xylopyranoside and xylobiose as donors to p-aminophenyl-1-thio- β -D-xylopyranoside

as acceptor. The formation of the p-aminophenyl-1-thio- β -D-xylobioside as a product, catalyzed by the enzyme, was confirmed by using MALDI-TOF method (Fig 1.).

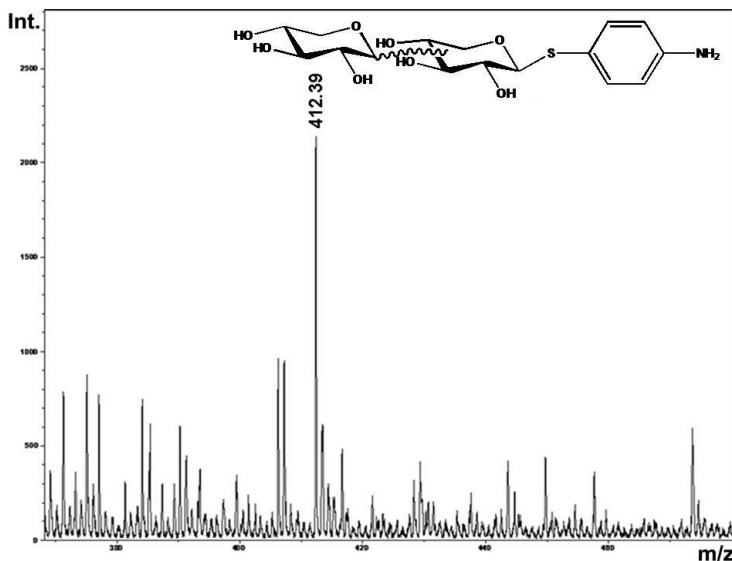


Fig. 1. MALDI-TOF MS spectrum of the reaction mixture.

Considering that previous results already proved that the enzyme works with inverting hydrolytic mechanism, it was a reasonably surprise to observe that the enzyme could perform transxylosylation activity both with pNP- β -D-xylopyranoside and xylobiose donors which can be called unique among the inverting xylan 1,4- β -xylosidases.

4.8. Kinetic Studies of Chemical Modification of the Catalytic Residues

4.8.1. Specific Chemical Modification of the Carboxylate Groups

In the case of the chemical modification of carboxylate groups water soluble 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC) and glycine methyl ester as nucleophile were used. During the inactivation the carboxyl groups were activated by EDAC, the glycine methyl ester formed the activated carboxyl group to amide (Fig. 2.).

Summarizing the results it can be established, that the enzyme was inactivated completely by these reagents during the inactivation. The chemical modification of the enzyme affected not only the carboxylate groups in the active center, but most likely the other carboxylate groups of the enzyme as well. However the fact, that the competitive inhibitor (β -D-xylopyranosylazide) protected the enzyme against inactivation proves that a catalytically essential carboxylate group in the active site was also modified. These results demonstrated well that the modified group is a carboxylate group, which is involved in the catalytic center of the enzyme.

The pH dependence of the inactivation proved that during the reaction the catalytic acid/base was modified.

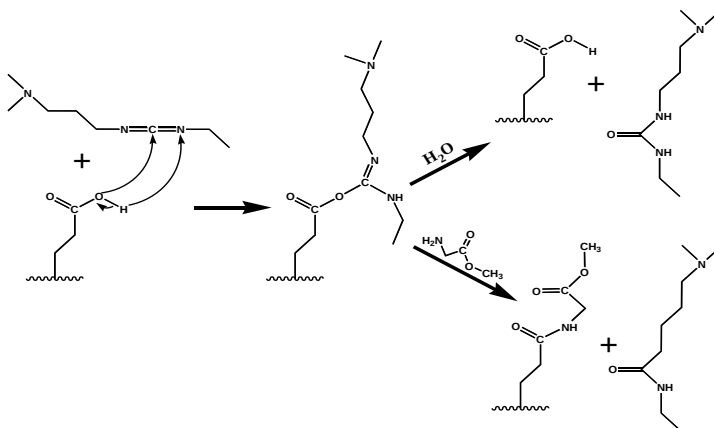


Fig. 2. Reaction of the EDAC with the catalytically active carboxyl side chain in presence and absence of glycine methyl ester.

4.8.2. Chemical Modification of the Enzyme with Affinity Label

For further investigation of the active site of the enzyme affinity label N-bromoacetyl- β -D-xylopyranosylamine (NBAXA) was used, what is substrate analogue molecule and it was synthesized by a simpler method than previously (Fig. 3.).

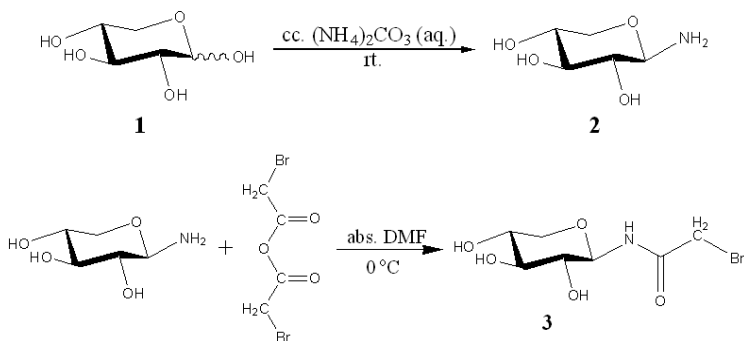


Fig. 3. Synthesis of the NBAXA.

The NBAXA is not only able to bind easily in the active site due to its substrate analogue nature but because of the presence of the bromoacetic group it can also alkylate the nucleophilic groups in the active site (Fig. 4.). This covalent binding leads to complete loss of the activity, most often because it blocks either physically the access to the active site or modifies an active site residue which can be critical in catalysis. Competitive inhibitor could protect partially the active center from the chemical modification whereas it binds to the same place where the inactivator.

The pH dependence of the inactivation showed the same result that the catalytic acid/base was modified just as in the case of the EDAC, glycine methyl ester modification (Fig.4.).

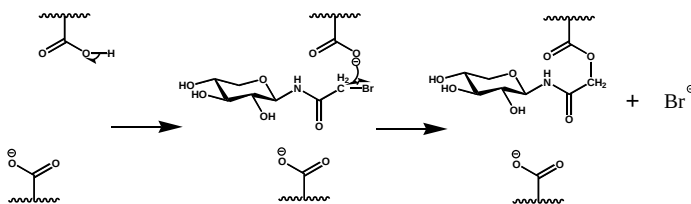


Fig. 4. Reaction of the NBAXA with the catalytic acid/base group.

The pH dependence studies of the EDAC and NBAXA demonstrated well, that both inactivators blocking effect on the enzyme activity increased significant when the catalytic acid/base was deprotonated. This fact proves a more important role of the

catalytic acid/base compared to the nucleophile involved in the hydrolytic process in the case of the inverting enzymes in contrary to the retaining enzymes.

4.9. CD spectroscopy investigations of the NBAXA inactivated enzyme

Comparisons of the recorded CD spectra, about the active and inactivated enzyme showed a significant distortion in the secondary structural elements when a substrate analogue molecule blocks the active center. Due to this blocking the substrate binding part stabilizes the enzyme in an intermediate state. This can also be supported by the fact, that the ordered secondary structural elements of the enzyme like the β -strand and β -turn regions decompose and form unordered structures as a result of the inactivation (Table 3.).

Table 3. Deconvolution of active and inactive xylan 1,4- β -xylosidase spectra

Enzyme	α -helix	β -strand	β -turn	Unordered
Active	2.6-4.8 %	38.3-43.3 %	19.6-22.4 %	32.2-34.7 %
Inactive	2.5-3.5 %	29.6-32.9 %	14.7-17.3 %	47.5-52.1 %

5. Utilization Possibilities of the Results

According to our results the recombinant xylan 1,4- β -xylosidase enzyme from *Thermobifida fusca* TM51 could be an optimal candidate for biotechnological application, among others in the recycling of the biomass, since it has high catalytical efficiency in degradation of short xylooligosaccharides and also considerable thermal and pH stability. Besides the strict substrate specificity of the enzyme could be utilized as xylose detection and quantitation as a part of a biosensor or as part of a xylose specific assay.

In addition our results give new informations about the mechanism of action and active site topology of a thermophilic bacterial xylan 1,4- β -xylosidase. Considering the ever growing need in different fields of the biotechnological and chemical industries these results show the increasing importance of the xylan 1,4- β -xylosidases.

6. List of Publication

Publications Related to the Discussion of the Dissertation

1. **Csaba Attila Fekete** and László Kiss
Purification and Characterization of a Recombinant xylan β -D-xylosidase from *Thermobifida fusca* TM51
The Protein Journal (2012) 31(8), 641-650, DOI 10.1007/s10930-012-9440-7
IF: 1,038
2. **Csaba Attila Fekete** and László Kiss
A New Approach in the Active Site Investigation of an Inverting β -D-xylosidase from *Thermobifida fusca* TM51
The Protein Journal (2013) DOI 10.1007/s10930-013-9463-8
IF: 1,038
3. Kukolya József, **Fekete Csaba Attila**, Dóri-Tóth Zoltán, Vanderleyden Jos, Spaepen Stijn, Wilson David B., Kiss László
Cloning and biochemical characterization of a B-xylosidase (XynA). A new member of the hemicellulase enzyme system of *Thermobifida fusca*.
Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (2005) 52 (Suppl.): 87.
IF: 0,787

Other Publications:

4. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Hemicelluláz enzimek stabilizálása nano-réteggel
Műszaki Szemle (2010) 52, 15-20. ISSN 1454-0746
5. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Stabilization of hemicellulase enzymes with nano-layer
Studia Universitatis Babes-Bolyai Seria Chemia (2010) LIV, 53-62. ISSN 1224-7154 (printed edition) ISSN 2065-9520 (online edition)
IF: 0.231
6. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Cellulase and hemicellulase enzymes as single molecular nanobiocomposites

Hungarian Journal of Industrial Chemistry (2011) 39 (3) 341-348. ISSN: 0133-0276

IF: 0.120

7. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Thermostable enzymes as single molecular nanobiocomposites
Internet Journal of Engineering and Technology for Young Scientists (2011) in press

Lectures and Posters:

8. **Fekete Csaba Attila**, Kiss László
A Thermobifida fusca-ból származó intracelluláris β -D-xilozidáz enzim működési mechanizmusának vizsgálata
MTA Szénhidrátkémiai Munkabizottság Ülése, Mátrafüred, 2007. május 23-25.
9. **Fekete Csaba Attila**, Kiss László
A Thermobifida fusca-ból származó intracelluláris β -D-xilozidáz enzim működési mechanizmusának vizsgálata
A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi Vándorgyűlése, Debrecen, 2007. augusztus 26 – 29.
10. **Csaba Attila Fekete**, Teréz Barna, Rita Elek, Gyula Batta, József Kukolya and László Kiss
Investigation of the Active Site of the intracellular β -D-xylosidase from *Thermobifida fusca*
11th Bratislava Symposium on Saccharides, Smolenice, Slovak Republic, 21-26 September 2008
11. **Fekete Csaba Attila**, Elek Rita, Batta Gyula, Kukolya József, Kiss László és Barna Teréz
A Thermobifida fusca-ból származó intracelluláris β -D-xilozidáz enzim aktív centrumának topológiai vizsgálata
Biokémia, A Magyar Biokémiai Egyesület folyóirata, (2010) XXXIV. ÉVFOLYAM 3. SZÁM, P2-05
12. Rita Elek, Teréz Barna, Ágnes Hubert, **Csaba Attila Fekete**, Gyula Batta, László Kiss and József Kukolya

Transformation of *Thermobifida fusca* β -D-mannosidase to mannosynthase by site-directed mutagenesis

11th Bratislava Symposium on Saccharides, Smolenice, Slovak Republic, 21-26 September 2008

13. Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**, Elek Rita, Batta Gyula, Csendes Gergely, Tóth Ákos Kukolya József
Characterization of the hemicellulolytic system of the plant wall degrader model organism *Thermobifida fusca*
Annual Meeting of the Hungarian Society of Microbiology (2010) Book of abstracts, p.8.
14. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Hemicellulóz bontó egyedi enzim nanorészecskék előállítása (*Single enzyme nanoparticles with hemicellulolytic activity*)
Műszaki Kémiai Napok '10 kiadványa (2010) Veszprém, pp. 208-215
15. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Akrilamid réteggel stabilizált egyedi enzim nanorészecskék aktivitásának vizsgálata
(*Activity measurement of single enzyme nanoparticles using acrylamide layer*)
Műszaki Kémiai Napok '11 kiadványa (2011) Veszprém, pp. 149-156.
16. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Single enzyme nanoparticles using thermostable hemicellulase enzymes, „Challenges in
Physical Chemistry and Nanoscience” (ISACS2), Budapest, Hungary, 13-16 July 2010
17. Hegedüs Imre, Nagy Endre, Kukolya József, Barna Teréz, **Fekete Csaba Attila**
Stabilization of cellulase and hemicellulase enzymes as enzyme nanoparticles,
EuroNanoForum 2011, Budapest, Hungary (*electronic version*)